

肺細胞マクロファージにおける酸化窒素シグナル系を介するインターフェロン- の細胞質運動能とアクチン重合に対する作用

著者	福島 健泰
号	2487
発行年	1993
URL	http://hdl.handle.net/10097/20829

氏 名（本籍） ふく しま たけ やす
福 島 健 泰

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 4 8 7 号

学位授与年月日 平 成 5 年 2 月 24 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 61 年 3 月 20 日
新潟大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 Interferon-gamma drives cytoplasmic motion
and actin assembly in alveolar macrophages
via nitric oxide-dependent signalling path-
ways.

（肺細胞マクロファージにおける酸化窒素シグナ
ル系を介するインターフェロン- γ の細胞質運動
能とアクチン重合に対する作用）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 佐々木 英 忠 教授 白 土 邦 男

教授 菅 村 和 夫

論 文 内 容 要 旨

【 始 め に 】

単核食細胞系 (mononuclear phagocyte system) に属する肺胞マクロファージ (AM) は、さまざまな細胞機能を有している。肺は、経気管支的に直接外界異物の暴露にさらされる特異的臓器であり、その環境の中で肺胞マクロファージは異物の処理、病原体の殺菌不活化、抗原提示を含めた炎症免疫反応の誘導など生体防御機構において大切な役割を担っている。特に細胞骨格系 (cytoskeletal network) に関連する細胞質運動能 (cytoplasmic motility, motion) は、遊走能、どん食能、固着能、分泌能、細質分裂と深く関わっている。従って、細胞質運動能を調べることは、宿主の免疫防御メカニズムを理解する上で重要なことである。我々は、今までどん食された鉄粒子から発生する残留磁気 (RFS) 測定法を用いて細胞質運動能を定量化し、種々の薬剤に対する反応を調べてきた。又、サイトカインの一つであるインターフェロンガンマ ($\text{IFN-}\gamma$) は、多種の機能を持つサイトカインで、肺胞マクロファージの生理的機能を変化しうる。例えば IgG Fc レセプターの発現を増加させたり、toxic oxygen radical を release させるなどである。今回、我々は magnetic particle method を用いて肺胞マクロファージの細胞質運動能における $\text{IFN-}\gamma$ の効果を調べ、その作用メカニズムを in vitro 系で調べた。

【 方 法 】

動物はラットを用いた。3 mg の鉄粒子 (Fe_3O_4) を生食に溶解し経気管支的に肺に注入する。4 日後鉄粒子をどん食した肺胞マクロファージを気管支肺胞洗浄 (BAL) にて採取する。そのマクロファージを培養プラスチックバイアルの底に固着させ、 CO_2 インキュベーターで培養する。一つの well には、 5×10^6 個マクロファージが入っている。その細胞に10秒間 74 mili Tesla (mT) の磁場をかけ磁化する。磁化直後、バイアルをフラックスゲート磁力計の上に移動させ、どん食された鉄粒子から発生する残留磁気を 5 分間測定する。その測定原理を説明する。鉄粒子が肺胞マクロファージにどん食されて細胞質内に存在する場合には、残留磁気は時間と共に徐々に減衰する。この現象を relaxation (リラクゼーション) と呼ぶ。これは細胞質内の鉄粒子が磁化直後一過性に一方方向に並び極性が一致することにより生じる最大磁力が、細胞骨格系から生み出される回転力によって粒子が回転し、極性が多方向となることにより生じる現象である。この減衰カーブより、減衰率 (relaxation rate: λ_0) を算出する。すなわち減衰率が大きい程細胞質運動能が亢進していることを示す。

【結 果】

IFN- γ の relaxation rate (λ_0) に対する濃度依存効果を調べた。IFN- γ を加えて60分後の残留磁気を測定し、 λ_0 を算出した。IFN- γ は濃度依存性に細胞質運動能を亢進させその効果は1000単位/mlで最大であった。(125% of control)。この IFN- γ の細胞質運動能亢進の作用メカニズムを更に調べた。肺泡マクロファージは IFN- γ や LPS などの刺激により多種の toxic oxygen radical を放出して細菌などに対して作用を及ぼすことがわかっている。その oxygen radical の一つ nitric oxide (NO) は、細胞機能を regulate する物質として近年研究が進んでいる。そこで我々は、NO が IFN- γ による細胞質運動能に何らかの関与をしているのではないかと考え、以下の実験を行った。NO 合成酵素の阻害剤 L-NMMA は、IFN- γ の亢進作用を阻害した。又、NO の代謝産物である NO_2^- を測定することにより、IFN- γ が NO を産出することを証明した。これらの結果により IFN- γ の作用に NO signalling pathway が関与していることが示唆された。更にこの伝達過程を調べた。db cyclicGMP は、細胞質運動能を亢進させ、db cyclicAMP は逆に低下させた。Methylene blue (guanylyl cyclase 阻害剤)、KT5823 (protein Kinase G 阻害剤)、cytochalasin D (microfilament 重合阻害剤) は IFN- γ の効果をそれぞれ有意に低下させた。更に IFN- γ の亢進効果を microfilament の主成分であるアクチンの重合に焦点をあて fluorescent activated cell sorter (FACS) を用いて調べた。G-actin から F-actin へ転換により actin は機能するが F-actin を特異的に染色する NBD-phalloidin を用いて F-actin の定量化を行った。IFN- γ は F-actin を濃度依存性に増加させ、その効果は db cyclicGMP で再現された。

【結 語】

鉄粒子をどん食した肺泡マクロファージを磁化し発生する残留磁気を測定することにより細胞質運動能を定量化した。IFN- γ は肺泡マクロファージの細胞質運動能を亢進させた。その作用メカニズムは、NO 産生による NO-guanylyl cyclase-cyclicGMP-PKG という NO dependent signalling pathway を介しており、G-actin から F-actin の転換という actin 重合を伴うものである。

審 査 結 果 の 要 旨

肺胞マクロファージ (AM) は異物の処理, 病原体の殺菌不活化, 抗原提示を含めた炎症免疫反応の誘導など生体防御機構において大切な役割を担っている。特に細胞骨格系 (cytoskeletal network) に関連する細胞質運動能 (cytoplasmic motility, motion) は, 遊走能, どん食能, 固着能, 分泌能, 細胞質分裂と深く関わっている。今回, 著者は残留磁気測定法を用いて AM の細胞質運動能におけるインターフェロン γ (IFN- γ) の効果を調べ, その作用メカニズムを *in vitro* 系で調べた。

3 mg の鉄粒子 (Fe_3O_4) を生食に溶解し経気管支的にラットの肺に注入する。4 日後鉄粒子をどん食した肺胞マクロファージを気管支肺胞洗浄 (BAL) にて採取する。培養した AM 5×10^6 個に 10 秒間 74 mT (mT) の磁場をかけ磁化する。磁化直後, 細胞をフラックスゲート磁力計の上に移動させ, どん食された鉄粒子から発生する残留磁気を 5 分間測定する。その測定原理を説明する。鉄粒子が肺胞マクロファージにどん食されて細胞質内に存在する場合には, 残留磁気は時間と共に徐々に減衰する。この現象を relaxation (リラクゼーション) と呼ぶ。これは細胞質内の鉄粒子が磁化直後一過性に一方に並び極性が一致することにより生じる最大磁力が, 細胞骨格系から生み出される回転力によって粒子が回転し, 極性が多方向となることにより生じる現象である。この減衰カーブより, 減衰率 (relaxation rate: λ_0) を算出する。すなわち減衰率が大きい程細胞質運動能が亢進していることを示す。

IFN- γ の relaxation rate (λ_0) に対する濃度依存効果を調べた。IFN- γ は濃度依存性に細胞質運動能を亢進させその効果は 1000 単位/ml で最大であった。(125% control)。この IFN- γ の細胞質運動能亢進の作用メカニズムにおいて oxygen radical である nitric oxide (NO) の関与を考え以下の実験を行った。NO 合成酵素の阻害剤 L-NMMA は, IFN- γ の亢進作用を阻害した。又, NO の代謝産物である NO_2^- を測定することにより, IFN- γ が NO を産出することを証明した。又 db cyclic GMP は, 細胞質運動能を亢進させ, db cyclic AMP は逆に低下させた。Methylene blue (guanylyl cyclase 阻害剤), KT5823 (protein Kinase G 阻害剤), cytochalasin D (microfilament 重合阻害剤) は IFN- γ の効果をそれぞれ有意に低下させた。更に F-actin を特異的に染色する NBD-phalloidin を用いて F-actin の定量化を行った。IFN- γ は F-actin を濃度依存性に増加させ, その効果は db cyclic GMP で再現された。

〈結語〉 鉄粒子をどん食した肺胞マクロファージを磁化し発生する残留磁気を測定することにより細胞質運動能を定量化した。IFN- γ は肺胞マクロファージの細胞質運動能を亢進させた。その作用メカニズムは, NO 産生による NO-guanylyl cyclase-cyclic GMP-PKG という NO dependent signalling pathway を介しており, G-actin から F-actin の転換という actin 重合を伴うものである。本論文は学位に値するものとする。